

## PTOV1 在 I 型子宫内膜癌表达的临床病理意义及分子机制研究

黄丽斯,梁雪莹,金海英,胡银笑,谭玲玲,甘玉杰\*

(广东省中山市博爱医院妇产科,广东中山 528400)

**摘要:** **目的** 探讨前列腺肿瘤过表达基因 1(PTOV1)在 I 型子宫内膜癌组织中检测的意义及表达调控的分子机制。 **方法** 收集本院住院治疗的 46 例 I 型子宫内膜癌患者手术切除肿瘤组织及癌旁组织,免疫组化法检测组织中 PTOV1 蛋白的表达,比较癌组织与癌旁组织的差异,亚硫酸氢盐测序法检测 PTOV1 启动子甲基化状态,比较癌组织与癌旁组织的差异,统计分析 PTOV1 蛋白表达与 I 型子宫内膜癌患者临床参数的关系,PTOV1 启动子甲基化与蛋白表达的关系及其与患者临床参数的关系。 **结果** PTOV1 在 I 型子宫内膜癌组织中高表达且启动子低甲基化;PTOV1 高表达与 I 型子宫内膜癌患者年龄、肿瘤大小、组织分化程度、淋巴结转移无关,与浸润深度呈正相关;PTOV1 启动子低甲基化与 I 型子宫内膜癌组织中 PTOV1 表达呈正相关。 **结论** PTOV1 与 I 型子宫内膜癌浸润密切相关,其高表达的机制可能为启动子发生低甲基化。

**关键词:** 前列腺肿瘤过表达基因 1; I 型子宫内膜癌; 低甲基化; 浸润

中图分类号:R737.33 文献标识码:A

## The clinical pathological significance and molecular mechanism of PTOV1 in type I endometrial cancer

HUANG Lisi, LIANG Xueying, JIN Haiying, et al

(Gynecology and Obstetrics Department of Zhongshan Boai Hospital, Zhongshan 528400, Guangdong, China)

**Abstract:** **Objective** To identify the significance of detecting prostate tumor overexpressed 1 (PTOV1) and the mechanism of its expression regulation in type I endometrial cancer. **Methods** Forty-six tumor tissues and para-cancer tissues from type I endometrial cancer patients were collected. The expression of PTOV1 protein in type I endometrial cancer tissues and para-cancer tissues was detected by immunohistochemistry. The methylation status of PTOV1 was tested by bisulfite sequencing PCR. The differences between cancer tissues and para-cancer tissues were analyzed. The correlation between the PTOV1 expression and clinical parameters, the methylation status of PTOV1 and its expression, and the methylation status of PTOV1 and clinical parameters was statistically analyzed. **Results** The expression of PTOV1 was increased and promoter methylation status was decreased in type I endometrial cancer tissues. There was no correlation between PTOV1 expression and age, tumor size, differentiation degree, lymph node metastasis. But PTOV1 expression was positively related to invasion depth. Hypomethylation of PTOV1 promoter was positively related to its expression in type I endometrial cancer.

**Conclusion** PTOV1 expression was correlated with type I endometrial cancer invasion depth. The mechanism of PTOV1 expression may be promoter hypomethylation.

**Key words:** prostate tumor overexpressed 1; type I endometrial cancer; hypomethylation; invasion

收稿日期:2017-03-08;修回日期:2017-06-10

基金项目:本项目由中山市科技计划项目(2015B1173)和中山市卫生与计划生育局医学项目(2016J103)资助。

\* 通讯作者, E-mail:44926307@qq.com.

子宫内膜癌是常见的女性恶性肿瘤,致病因素包括:遗传变异、表观遗传改变、环境因素及内分泌因素。该病的 5 年生存率可高达 85%,但是有转移的患者预后很差,中位生存时间大约为 1 年,并且在

过去的10年中未见提高。子宫内膜癌分为雌激素依赖型(I型)和非雌激素依赖型(II型),I型子宫内膜癌绝大部分为子宫内膜样癌,少部分为黏液腺癌;II型子宫内膜癌为浆液性癌,透明细胞癌等。约80%~85%的患者为I型,常分化较好,预后较好。而II型预后差,生存时间短<sup>[1]</sup>。

前列腺肿瘤过表达蛋白1(prostate tumor over-expressed 1,PTOV1)是一个保守的衔接蛋白(adaptorprotein),首次发现在前列腺癌中高表达而得名,与脂筏蛋白(lipid raft protein) flotillin-1相互作用,以细胞周期依赖的方式将flotillin-1从胞浆转运至胞核中<sup>[2]</sup>。PTOV1的过表达与肿瘤级别的增高、细胞增殖密切相关,如:乳腺癌、卵巢癌、鼻咽癌、肝癌等<sup>[3]</sup>。有研究表明,PTOV1在前列腺癌中高表达的一个机制是基因扩增<sup>[4]</sup>。但是,其在子宫内膜癌中的表达、功能及调控机制暂不明确。

表观遗传调控机制包括:DNA甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA。DNA甲基化是表观遗传调控中研究最多的一个机制。DNA甲基化在人体中由DNA甲基转移酶DNMT1、DNMT3A和DNMT3B调控,将甲基转移到胞嘧啶的5位碳原子上。基因启动子区的CpG岛发生甲基化可导致基因表达沉默,而发生低甲基化则基因表达增加<sup>[5]</sup>。DNA甲基化改变是肿瘤发生发展的重要机制,也是诊断、预后判定及治疗肿瘤的潜在生物学标志物<sup>[1]</sup>。

因此,本研究拟通过检测PTOV1的表达及启动子甲基化状态,确定PTOV1在I型子宫内膜癌组织中的表达情况、临床意义及初步探讨可能的表达调控机制,从而为PTOV1作为I型子宫内膜癌治疗靶点提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 收集2013年6月~2015年7月广东省博爱医院入院治疗的46例I型子宫内膜癌患者的肿瘤组织及癌旁组织。入组条件:采集样本时患者未进行任何治疗;手术切除标本制成石蜡切片,经2名病理科医生诊断为I型子宫内膜癌;免疫组化检测结果为雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)表达阳性;无其他免疫系统疾病、内分泌疾病或长期服用激素史。诊断标准:病理诊断为子宫内膜样腺癌,免疫组化检测结果为ER和PR表达阳性<sup>[1]</sup>。本研究经广东省中山市博爱医院伦理委员

会批准。收集46例I型子宫内膜癌患者中,年龄38~69岁,中位数为57岁,≥57岁29例,<57岁17例;肿瘤直径≥3cm的15例,<3cm的31例;有淋巴结转移16例,无淋巴结转移30例;高分化21例,中分化18例,低分化7例;肌层浸润超过1cm的14例,未超过1cm的32例。

**1.2 组织DNA提取** 利用基因组DNA提取试剂盒(Takara,大连)提取2mg新鲜I型子宫内膜癌组织及癌旁3cm处组织DNA,操作步骤根据试剂盒说明书进行。Nanodrop2000(Thermo公司)检测DNA浓度和质量。-20℃保存备用。

**1.3 亚硫酸氢盐测序法PCR(Bisulfite sequencing PCR,BSP)** 用EZ DNA Methylation™ Kits(ZY-MOResearch,USA)对1.0μg基因组DNA进行重亚硫酸氢盐修饰。2.5U Taq mix(Takara,大连),0.5μL 1mol/L正向和负向引物,100ng修饰后的DNA,加水至25μL体系。正向引物:5'-AAGGGGT-TAGTTTGGTGTT-3',负向引物:5'-AACAAAAA-CAAAATATAAACTCAACAATv3'。PCR产物包含PTOV1启动子区-200至0位置。反应条件:95℃5min,95℃0.5min,57.5℃1min,72℃1min,40个循环,延伸72℃10min。1%琼脂糖凝胶电泳,纯化PCR产物。将纯化后的PCR产物连接至pGEM-T载体(Promega,USA),转化至感受态JM109细胞(Takara,大连),挑选10个克隆,扩增后进行测序(英潍捷基,广州)。计算肿瘤组织与癌旁组织PCR产物中CG位点甲基化百分比,低甲基化率=(1-CG位点甲基化百分比)×100%<sup>[6]</sup>,低甲基化率小于对照组均数-标准差的为低甲基化。

**1.4 免疫组化法** 使用UltraSensitive™ SP(Mouse/Rabbit)IHC Kit(KIT-9710,福州迈新生物技术开发有限公司,福州),步骤如下:新鲜组织脱水包埋制成石蜡切片,脱蜡至水,PBS冲洗3次;pH=6.0柠檬酸盐缓冲液加热沸腾10min进行抗原修复,PBS冲洗3次;加1滴3% $H_2O_2$ (A液),室温下孵育10min,PBS冲洗3次;加1滴B液(羊血清),室温下孵育10min,拭去液体;加PTOV1一抗,稀释浓度1:200(ab81173,Abcam),4℃孵育过夜,PBS冲洗3次;加1滴C液,室温下孵育10min,PBS冲洗3次;加1滴D液,室温下孵育10min,PBS冲洗3次;DAB显色(Kit-0014,福州迈新生物技术开发有限公司,福州)5min,清水冲洗,苏木素复染3min,0.1%盐酸2s,自来水洗返蓝15min,脱水,透

明,中性树胶封片,光学显微镜下观察。根据染色程度计分:1分:-;2分:+;3分:++;4分:+++;根据组织中的阳性细胞数计分:1分:0%~25%;2分:26%~50%;3分:51%~75%;4分:76%~100%。两种计分方法得到的分数相乘, $<8$ 被认为低表达, $\geq 8$ 被认为高表达<sup>[3]</sup>。

**1.5 统计学分析** 采用 SPSS13.0 软件,用 *t* 检验统计分析 PTOV1 在 I 型子宫内膜癌组织及癌旁组织中启动子甲基化水平的差异;用 chi-square test 统计分析 PTOV1 甲基化与蛋白表达的关系及其与临床参数的关系;用 Pearson 检验分析 PTOV1 甲基化与蛋白表达的相关性。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 PTOV1 在 I 型子宫内膜癌组织中表达较癌旁组织高** 在 46 例 I 型子宫内膜癌组织中,PTOV1 高表达的 28 例,低表达 18 例;在癌旁组织中高表达的 8 例,低表达 38 例,统计分析显示,PTOV1 在 I 型子宫内膜癌组织中表达较癌旁组织高(图 1),差异有统计学意义( $\chi^2 = 25.477, P < 0.001$ )。

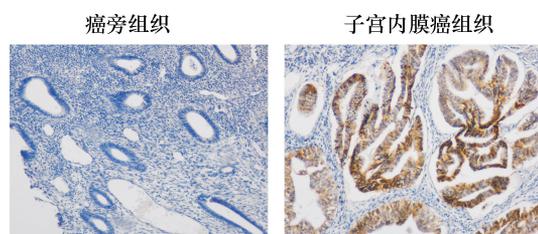


图 1 免疫组化检测 PTOV1 在 I 型子宫内膜癌组织及癌旁组织中的表达( $\times 100$ )

**2.2 PTOV1 表达与 I 型子宫内膜癌患者临床参数的关系** 统计分析显示,PTOV1 高表达与 I 型子宫内膜癌患者年龄、组织分化程度、肿瘤大小及淋巴结转移无关( $P > 0.05$ ),与肿瘤浸润深度密切相关,差异有统计学意义( $P = 0.026$ )。见表 1。

表 1 PTOV1 表达与 I 型子宫内膜癌患者临床参数的关系

变量	高表达	低表达	P	$\chi^2$
总例数(N=46)	30	16		
年龄(岁)			0.558	0.343
<57 (29)	18	11		
$\geq 57$ (17)	12	5		
分化程度			1.000	0.140
低-未分化(7)	5	2		
高一中分化(39)	25	14		
肿瘤直径(cm)			0.605	0.267
<3 (31)	21	10		
$\geq 3$ (15)	9	6		
淋巴结转移			0.777	0.080
有(16)	10	6		
无(30)	20	10		
浸润深度(cm)			0.026	5.370
<1 (30)	16	14		
$\geq 1$ (16)	14	2		

**2.3 PTOV1 启动子在 I 型子宫内膜癌中低甲基化** 作者用在线软件 Methprimer(网址:<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)分析了 PTOV1 基因转录起始位点上游启动子区 1 000 bp 序列,发现存在 CpG 岛(图 2)。然后作者利用 BSP 检测了 PTOV1 转录起始位点至上游 200 bp 处 DNA 甲基化状态(图 3)。结果表明,25 例患者癌组织 PTOV1 启动子发生低甲基化,13 例癌旁组织发生启动子低甲基化,统计分析表明,差异有统计学意义( $P = 0.011$ )。见表 2。

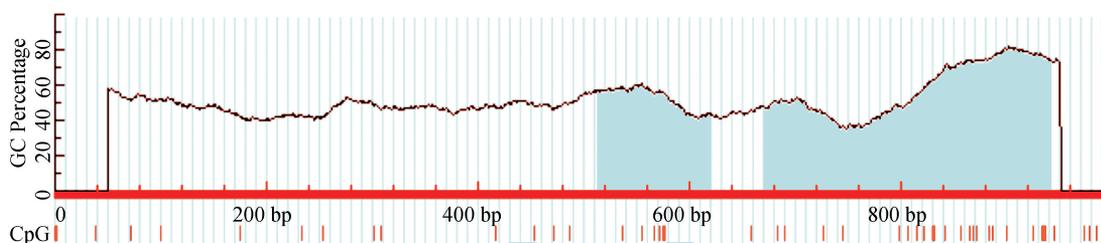


图 2 Methprimer 软件预测 PTOV1 启动子 CpG 岛

**2.4 I 型子宫内膜癌中 PTOV1 表达与启动子甲基化状态相关性分析** 统计分析显示(图 4),在 I

型子宫内膜癌组织中 PTOV1 表达与其启动子低甲基化率呈正相关,相关系数为 0.799( $P < 0.001$ )。

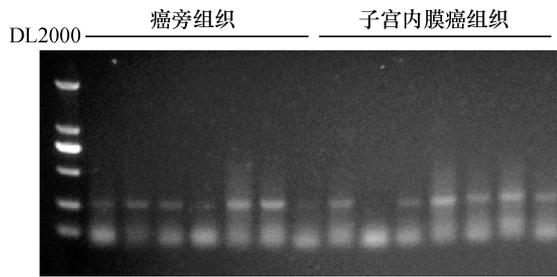


图3 BSP检测PTOV1启动子甲基化状态  
DL2000为DNA电泳标记物

表2 PTOV1在I型子宫内腺癌组织及癌旁组织中启动子低甲基化率的比较

变量	高甲基化	低甲基化	P	$\chi^2$
癌组织	21	25	0.011	6.456
癌旁组织	33	13		

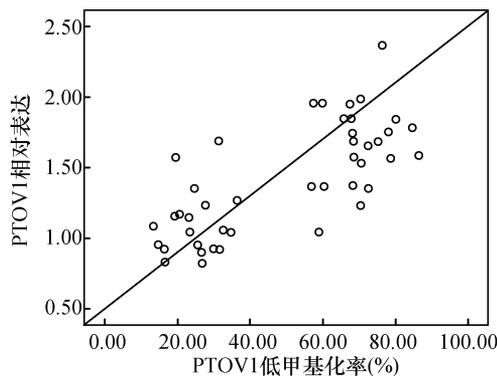


图4 I型子宫内腺癌中PTOV1蛋白表达与启动子低甲基化率的相关性分析

### 3 讨论

PTOV1基因定位于染色体19q13.3,全长9.51 kb,包含12个外显子。其中,外显子3~6编码A结构域,外显子7~12编码B结构域<sup>[7]</sup>。目前发现PTOV1有2个转录本,其中1个转录本编码416个氨基酸的蛋白,另一个转录本编码374个氨基酸的蛋白,两者N端和C端残基存在差异<sup>[8]</sup>。PTOV1的启动子区有转录因子SP1和SP2结合的保守区域以及雄激素反应元件<sup>[3]</sup>。

研究表明,PTOV1在多种肿瘤中高表达,并可作为鼻咽癌<sup>[9]</sup>、肝癌<sup>[10]</sup>及乳腺癌<sup>[11]</sup>预后预测的生物学标志物。也有研究表明,PTOV1在乳腺癌中过表达,并且通过活化Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进乳腺癌的发生发展<sup>[2]</sup>。而PTOV1在肿瘤中高表达的

机制和促进肿瘤生长的机制不明。

本研究首先检测了PTOV1在I型子宫内腺癌组织中的表达,结果表明PTOV1的表达较癌旁组织增高。这一结果与其他研究PTOV1在肿瘤中表达的结果一致。随后,本文统计分析了PTOV1表达与I型子宫内腺癌患者临床参数的关系,结果显示其仅与肿瘤浸润深度有关。有研究者发现,PTOV1的高表达浸润性的尿路上皮癌细胞增殖和去分化密切相关<sup>[12]</sup>。可能PTOV1在I型子宫内腺癌中也可发挥促进细胞增殖和去分化的作用,但是调控浸润的机制有待进一步研究。

多项研究表明PTOV1在肿瘤中发挥转录因子的作用。PTOV1在转移性前列腺癌组织中过表达,并可通过与SMRT、RBP-J $\kappa$ 、NCoR、HDAC1和HDAC4等蛋白相互作用抑制下游Notch信号通路多个靶基因,如:HES1和HEY1<sup>[13]</sup>。此外,PTOV1可通过募集HDAC至DKK1启动子区从而抑制其表达<sup>[2]</sup>。但是PTOV1表达调控机制研究甚少。

研究表明,多个基因的启动子在子宫内腺癌中发生高甲基化,如:APC、CHD1、COMT及PTEN等<sup>[14]</sup>。但目前对于单基因启动子低甲基化在子宫内腺癌中的作用及机制研究并不多。有研究者证实,CTCF/BORIS在子宫内腺癌中发生低甲基化,可能促进肿瘤发展<sup>[15]</sup>。上皮细胞粘附分子(EpCAM)启动子甲基化可通过调控骨形成蛋白基因家族多个基因促进子宫内腺癌的复发<sup>[16]</sup>。

本研究首先通过在线软件预测了PTOV1启动子,结果发现存在CpG岛,推测PTOV1可能在I型子宫内腺癌中因发生启动子低甲基化而高表达。随后,检测了I型子宫内腺癌组织中PTOV1启动子甲基化状态,结果表明PTOV1在肿瘤组织中的启动子低甲基化率高于癌旁组织,说明PTOV1启动子在I型子宫内腺癌中发生低甲基化。本研究统计了PTOV1启动子低甲基化与蛋白表达的关系,发现其启动子低甲基化与蛋白高表达呈正相关。所以,认为启动子低甲基化是PTOV1在I型子宫内腺癌中高表达的机制。

通过本研究,可明确PTOV1在I型子宫内腺癌中表达增加,并肿瘤浸润深度相关,其可能的机制是启动子低甲基化。但是PTOV1如何调控肿瘤浸润,机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Trimarchi MP, Yan P, Groden J, et al. Identification of en-

- ometrial cancer methylation features using combined methylation analysis methods [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0173242.
- [2] Cui Y, Ma W, Lei F, et al. Prostate tumour overexpressed-1 promotes tumorigenicity in human breast cancer via activation of Wnt/beta-catenin signalling [J]. *J Pathol*, 2016, 239(3):297-308.
- [3] Canovas V, Leonart M, Morote J, et al. The role of prostate tumor overexpressed 1 in cancer progression [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7):12451-12471.
- [4] Alana L, Sese M, Canovas V, et al. Prostate tumor Overexpressed-1 (PTOV1) down-regulates HES1 and HEY1 notch targets genes and promotes prostate cancer progression [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13:74.
- [5] Tost J. DNA methylation; an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker [J]. *Mol Biotechnol*, 2010, 44(1):71-81.
- [6] Xiaoping L, Zhibin Y, Wenjuan L, et al. CPEB1, a histone-modified hypomethylated gene, is regulated by miR-101 and involved in cell senescence in glioma [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e675.
- [7] Benedit P, Paciucci R, Thomson TM, et al. PTOV1, a novel protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homology blocks [J]. *Oncogene*, 2001, 20(12):1455-1464.
- [8] Aken BL, Ayling S, Barrell D, et al. The Ensembl gene annotation system [J]. *Database (Oxford)*, 2016;2016.
- [9] Yang Q, Lin H, Wu S, et al. Prostate Tumor overexpressed 1 (PTOV1) is a novel prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and poor survival outcomes [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0136448.
- [10] Chen SP, Zhang LS, Fu BS, et al. Prostate tumor overexpressed 1 is a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma progression and overall patient survival [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(4):e423.
- [11] Lei F, Zhang L, Li X, et al. Overexpression of prostate tumor overexpressed 1 correlates with tumor progression and predicts poor prognosis in breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:457.
- [12] Rausch S, Hennenlotter J, Scharpf M, et al. Prostate tumor overexpressed 1 expression in invasive urothelial carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(5):937-947.
- [13] Liu C, Li Z, Bi L, et al. NOTCH1 signaling promotes chemoresistance via regulating ABCC1 expression in prostate cancer stem cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 393(1-2):265-270.
- [14] Farkas SA, Sorbe BG, Nilsson TK. Epigenetic changes as prognostic predictors in endometrial carcinomas [J]. *Epigenetics*, 2017, 12(1):19-26.
- [15] Hoivik EA, Kusonmano K, Halle MK, et al. Hypomethylation of the CTCFL/BORIS promoter and aberrant expression during endometrial cancer progression suggests a role as an Epi-driver gene [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(4):1052-1061.
- [16] Hsu YT, Gu F, Huang YW, et al. Promoter hypomethylation of EpCAM-regulated bone morphogenetic protein gene family in recurrent endometrial cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(22):6272-6285.

(本文编辑:蒋湘莲)